

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/05991 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/864**,  
15/35, 15/62, C07K 14/015, 19/00, C12N 5/10, C12Q  
1/68, G01N 33/68, A61K 39/23, 48/00

D-81475 München (DE). **RIED, Martin** [DE/DE]; Am  
Lohwald 36, D-86697 Sinning (DE). **KÖRNER, Christof**  
[DE/DE]; Karolinen Strasse 3, D-80538 München (DE).  
**MOEBIUS, Ulrich** [DE/DE]; Am Rain 1, D-82131  
Gauting-Unterbrunn (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06861

(22) Internationales Anmeldedatum:  
18. Juli 2000 (18.07.2000)

(74) **Anwalt: BÖSL, Raphael**; Bardehle, Pagenberg, Dost,  
Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679  
München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:  
199 33 719.5 19. Juli 1999 (19.07.1999) DE

**Veröffentlicht:**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT**  
[DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, D-82152 Planegg/Mar-  
tinsried (DE).

— Mit internationalem Recherchenbericht.  
— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HALLEK, Michael**  
[DE/DE]; Brunnenstrasse 40, D-86938 Schondorf (DE).  
**GIROD, Anne** [FR/DE]; Appenzeller Strasse 123,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/05991 A1

(54) Title: **SCLEROPROTEIN OF AN ADENO-ASSOCIATED VIRUS WITH MODIFIED CHROMATOGRAPHIC PROPERTIES, THE PRODUCTION THEREOF AND USE OF THE SAME**

(54) Bezeichnung: **STRUKTURPROTEIN VON ADENO-ASSOZIIERTEM VIRUS MIT VERÄNDERTEN CHROMATOGRAPHISCHEN EIGENSCHAFTEN, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG**

(57) Abstract: The invention relates to a scleroprotein of an adeno-associated virus which contains at least one mutation. Said mutation causes the chromatographic properties to be modified. The invention also relates to the production of said scleroprotein and the use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus, das mindestens eine Mutation enthält, die eine Veränderung der chromatographischen Eigenschaften bewirkt, seine Herstellung und Verwendung.



5

**Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus mit veränderten chromatographischen Eigenschaften, seine Herstellung und Verwendung**

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus, das mindestens eine Mutation enthält, die eine Veränderung der chromatographischen Eigenschaften bewirkt, seine Herstellung und Verwendung.

Das AAV-Virus gehört zur Familie der Parvoviren. Diese zeichnen sich durch ein  
15 ikosaedrisches, unbehülltes Kapsid mit einem Durchmesser von 18 bis 30 nm aus, welches eine lineare, einzelsträngige DNA von ca. 5 kb enthält. Für eine effiziente Vermehrung von AAV ist eine Coinfektion der Wirtszelle mit Helferviren, beispielsweise mit Adenoviren, Herpesviren oder Vacciniaviren erforderlich. In Abwesenheit eines Helfervirus geht AAV in einen Latenzzustand über, wobei das  
20 Virusgenom in der Lage ist, stabil in das Wirtszellgenom zu integrieren. Die Eigenschaft von AAV, in das Wirtsgenom zu integrieren, macht es als Transduktionsvektor für Säugetierzellen besonders interessant. Für die Vektorfunktionen genügen im allgemeinen die beiden ca. 145 bp langen invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR: "Inverted Terminal Repeats"). Sie tragen die "cis"  
25 notwendigen Signale für Replikation, Verpackung und Integration in das Wirtszellgenom. Zur Verpackung in rekombinante Vektorpartikel wird ein Helferplasmid, welches die Gene für nicht-strukturelle Proteine (Rep-Proteine) und für strukturelle Proteine (Cap-Proteine) trägt, in verpackungsg geeignete Zellen, z.B. HeLa- oder 293-Zellen, transfiziert, die hierauf beispielsweise mit Adenovirus  
30 infiziert werden. Nach einigen Tagen erhält man ein Lysat, welches rekombinante AAV-Partikel enthält. Geeignete Helferplasmide sind z.B. bei Chiorini et al., (1995) Hum. Gene Ther. 6, 1531-1541 oder Girod et al. (1999), Nat. Med. beschrieben.

Das AAV-Kapsid besteht aus drei verschiedenen Proteinen: VP1, VP2 und VP3, deren relative Anteile 5% VP1, 5% VP2 und 90% VP3 sind. Die AAV-Kapsidgene sind am rechten Ende des AAV-Genoms lokalisiert und werden durch überlappende Sequenzen desselben offenen Leserahmens (ORF) unter Verwendung verschiedener Startkodons sowie zweier unterschiedlich gespleißter Transkripte kodiert. Das VP1-Gen enthält die ganze VP2-Gensequenz, welche wiederum die ganze VP3-Gensequenz mit einem spezifischen N-terminalen Bereich enthält. Die Tatsache, daß die überlappenden Leserahmen für alle drei AAV-Kapsid-Proteine kodieren, ist für die obligatorische Expression aller Kapsid-Proteine, wenn auch zu unterschiedlichen Anteilen, verantwortlich.

Die Molekularmassen der Kapsid-Proteine sind 87 kD für VP1, 73 kD für VP2 und 62 kD für VP3. Die Sequenzen der Kapsidgene sind in Srivastava, A. et al. (1983), J. Virol., 45, 555-564; Muzyczka, N. (1992), Curr. Top. Micro. Immunol., 158, 97-129, Ruffing, N. et al. (1992), J. Virol., 66, 6922-6930 oder Rutledge, E. A. et al. (1998) J. Virol. 72, 309-319 beispielsweise beschrieben. Die physikalische und genetische Karte des AAV-Genoms ist beispielsweise bei Kotin, R. M. (1994), Human Gene Therapy, 5, 793-801 beschrieben.

20

Zudem sind verschiedene AAV-Serotypen bekannt, von denen der menschliche AAV-Serotyp 2 (AAV2) am besten untersucht ist. In diesen Analysen zeigte sich, daß AAV Viren als virale Vektoren vorteilhafte Eigenschaften für die somatische Gentherapie besitzen. Die wesentlichen Vorteile sind die fehlende Pathogenität für den Menschen, die stabile Integration viraler DNA in das zelluläre Genom, die Fähigkeit, nicht teilende Zellen zu infizieren, die Stabilität des Virions, was die Aufreinigung zu hohen Titern ( $10^{13}$  bis  $10^{14}$  Partikel pro ml) ermöglicht, die geringe Antigenität sowie das Fehlen viraler Gene und Genprodukte im rekombinanten AAV-Vektor, was unter Sicherheitsaspekten für die Verwendung in der Gentherapie vor-

25

teilhaft ist. Die Klonierung von Genen in den AAV-Vektor erfolgt mittlerweile nach den dem Fachmann allgemein bekannten Methoden, wie sie z.B. in WO 95/ 23 867, bei Chiorini, J. A. et al. (1995), Human Gene Therapy, 6, 1531-1541 oder bei Kotin, R. M. (1994), supra, beschrieben sind.

5

Für die Verwendung von AAV als viralen Transduktionsvektor werden im allgemeinen hohe Titer an rekombinanten AAV-Partikeln benötigt. Durch die naturgegebene, verhältnismäßig geringe Produktion von Partikeln ist ein Weg, hohe Titer zu erzielen, eine effiziente Anreicherung der Partikel. Des weiteren müssen die  
10 Partikel insbesondere für in vivo Anwendungen möglichst frei sein von Verunreinigungen, die aus zellulären Bestandteilen, DNA, Proteine, Helferviren und Mediumbestandteilen bestehen können. Somit ist es notwendig, eine verbesserte Aufreinigung für AAV-Partikel zur Verfügung zu haben.

15 Ein grundlegende Möglichkeit zur Aufreinigung bietet die Chromatographie. Bei diesem physikalischen Trennverfahren erfolgt die Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Anhand der physikalischen Vorgänge läßt sich die Chromatographie in zwei Gruppen einteilen, die Adsorptionschromatographie mit einem Feststoff als stationärer Phase und die Verteilungschromatographie bei zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, wobei  
20 meist Mischformen vorkommen. Das Trennverhalten eines Stoffes in der Chromatographie hängt dabei von seinen chromatographischen Eigenschaften ab, insbesondere seiner Größe, seiner Ladung, seinem Adsorptionsverhalten, so seiner spezifischen Affinität, seiner Hydrophobizität, etc. Damit bieten die chroma-  
25 tographischen Eigenschaften einen zentralen Ansatzpunkt, um über eine Veränderung eine Verbesserung der Aufreinigung und damit beispielsweise eine Anreicherung oder höhere Reinheit zu erzielen, wobei bereits eine reine Veränderung, beispielsweise gegenüber dem Wildtyp, eine Trennung und damit bessere Aufreinigung erlauben kann.

Aufreinigungsverfahren für AAV, insbesondere mittels Chromatographie, sind beispielsweise in WO 97/08298 beschrieben, eine Mutation der Strukturproteine von AAV aber nicht. Des weiteren wird in WO 96/00587 auf AAV-Kapsid-Fusionsproteine hingewiesen, die mit der Kapsidbildung nicht interferieren und heterologe Epitope klinisch relevanter Antigene enthalten sollen, wodurch aber lediglich eine Immunantwort induziert werden soll. Die Veröffentlichung enthält außerdem nur einen allgemeinen Hinweis auf die Fusionsproteine ohne nähere Angaben zur Ausführbarkeit, insbesondere zu geeigneten Insertionsstellen. Eine Änderung chromatographischer Eigenschaften insbesondere zur Verbesserung der Aufreinigung, z.B. durch Änderung der Affinitäten, wird aber nicht beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Anmeldung war es daher, die Reinigungseigenschaften des AAV-Virus, insbesondere eines Strukturproteins, gegenüber dem Wildtyp zu verändern.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß Struktur- bzw. Kapsid-Proteine von AAV so modifiziert werden können, daß dadurch eine Änderung der chromatographischen Eigenschaften bewirkt wird.

20

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Strukturprotein von AAV, das mindestens eine Mutation enthält, die eine Änderung der chromatographischen Eigenschaften des Virus bewirkt. Dabei ist bevorzugt, daß die Änderung der chromatographischen Eigenschaften eine Verbesserung der Aufreinigung ermöglicht, insbesondere eine Anreicherung des Virus, bevorzugt der Virus-Partikel, zu höheren Titern, eine Aufreinigung zu größerer Reinheit und/oder eine effizientere Aufreinigung. Durch die veränderten chromatographischen Eigenschaften kann beispielsweise ein spezifischerer bzw. effizienterer Reinigungsschritt für Virus-Partikel im Rahmen einer Aufreinigung erzielt werden, der zu höheren Partikeltitern, zu reineren

Partikeln oder zu einer effizienteren Aufreinigung führt. Der Titer rekombinanter Partikel kann z.B. dadurch bestimmt werden, daß eine Partikel-enthaltende Lösung in einer Verdünnungsreihe auf eine Membran gegeben und diese Membran mit markierter AAV-DNA hybridisiert wird. Durch den Nachweis der hybridisierten DNA  
5 kann auf die Partikelkonzentration je nach Durchführung des Versuchs qualitativ oder quantitativ rückgeschlossen werden. Die Reinheit der Partikel kann durch das Verhältnis des Strukturproteins bzw. der Partikelproteine zu partikelfremden Proteinen bestimmt werden. Eine effizientere Aufreinigung liegt im Sinne der vorliegenden Erfindung dann vor, wenn die Aufreinigung beispielsweise aus weniger Schritten besteht, schneller verläuft oder insbesondere für eine großtechnische Anwendung  
10 billiger in der Durchführung ist.

Im Sinne dieser Erfindung liegt eine Änderung der chromatographischen Eigenschaften des Virus verbunden mit einer Verbesserung der Aufreinigung beispielsweise bereits dann vor, wenn die Mutation lediglich eine Verschiebung des Elutionsverhaltens auf einer Chromatographiesäule bewirkt, also beispielsweise zu niedrigeren oder höheren Salzkonzentrationen hin. Allgemeines Problem bei chromatographischen Reinigungen ist, daß die gewünschten Produktfraktionen (z.B. Viruspartikel) und Fraktionen von Verunreinigungen (andere Viren, Wildtyp-Viren, Reste von Zellysaten, DNA, Proteine, insbesondere Serumproteine) bei gleichem Salzgehalt in der gleichen Fraktion eluiert werden. Durch eine erfindungsgemäße gezielte Mutation und die damit verbundene Verschiebung des Elutionsverhaltens eluiert die Fraktion mit den gewünschten, mutierten Viruspartikeln dann aber nicht mehr mit der verunreinigten Fraktion sondern in einer anderen Elutionsfraktion (z.B. - je nach  
25 Ladung - bei höheren oder niedrigeren Salzkonzentrationen). Unter Umständen, aber nicht immer, bieten dabei Verschiebungen zu hohen Salzkonzentrationen, beispielsweise durch Insertion überwiegend positiv oder negativ geladener Aminosäuren oder His-TAG in das Kapsidprotein, besondere Vorteile, da Verunreinigungen meist kleine Bestandteile sind und bei üblichen Reinigungsverfahren meist bei geringeren  
30 Salzkonzentrationen eluieren. Die Kapsidmutanten binden dann beispielsweise bes-

ser an das Säulenmaterial und eluieren später, also bei höheren Salzkonzentrationen. Ein weiterer erwünschter Effekt aufgrund des Einbaus von geladenen Aminosäuren ist die Möglichkeit, Ionenaustauscher bei einem höheren Salzgehalt zu beladen, wodurch die Menge des benötigten Säulenmaterials reduziert werden kann, was die Handhabung erleichtert sowie in einem industriellen Herstellungsverfahren Kosten spart.

Es ist besonders bevorzugt, daß die Mutation im erfindungsgemäßen Strukturprotein keine wesentliche Verringerung der Infektiosität des Virus, insbesondere aber auch eine Erhöhung der Infektiosität, bewirkt. Unter Infektiosität versteht man im Sinne dieser Erfindung die Fähigkeit, Zellen zu transduzieren.

Eine weitere Ausgestaltung dieser Erfindung ist, daß das modifizierte Strukturprotein gegenüber dem Wildtyp-AAV eine erhöhte Hitzestabilität aufweist. So wäre bei erhöhter Hitzestabilität eine bessere Hitzeinaktivierung von unerwünschten anderen Mikroorganismen oder Viren möglich, als dies für Wildtyp-AAV der Fall ist. Derartige Strukturproteine ließen sich einfach dadurch ausfindig machen, in dem eine Vielzahl von Mutanten hinsichtlich ihrer Hitzestabilität getestet werden.

Des weiteren ist das modifizierte Strukturprotein vorzugsweise weiterhin zur Partikelbildung, d.h. zur Ausbildung eines ikosaedrischen Kapsids, befähigt, insbesondere in Form eines AAV-Kapsids, da Partikel bzw. Kapside als Träger von ausgewählten Verbindungen, z.B. rAAV-Transduktionsvektoren, besonders geeignet sind. Die Bildung von Partikeln läßt sich beispielsweise durch Elektronenmikroskopie nachweisen. Ein anderer Nachweis ist das Sedimentationsverhalten während einer Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation mit anschließendem, optionalen Nachweis von in den Partikeln enthaltener viraler DNA.



- 7 -

Im allgemeinen kann (können) die Mutation(en) im VP1-, VP2- und/oder VP3-Strukturprotein liegen, wobei das VP1- und/oder das VP3-Strukturprotein bevorzugt sind. Des weiteren kann das Strukturprotein von allen AAV-Serotypen abgeleitet sein, insbesondere von humanen Serotypen, vorzugsweise von AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 und/oder AAV6, vor allem von AAV2, AAV3 und/oder AAV6.

Die genannte Mutation kann eine Punktmutation, eine Mutation mehrerer Aminosäuren, eine oder mehrere Deletion(en), insbesondere eine oder mehrere Insertion(en) oder eine Kombinationen der genannten Modifikationen sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Aminosäuren einer funktionellen Sequenz inseriert, vorzugsweise solche, die für die Affinitätschromatographie geeignet sind.

15

Unter Affinitätschromatographie versteht man eine Methode der Chromatographie, die auf der Fähigkeit bestimmter zusammengehöriger Partner wie Antigen-Antikörper, Enzym-Substrat etc. beruht, sich gegenseitig zu erkennen und miteinander in Wechselwirkung zu treten. Dabei wird meist einer der zusammengehörigen Partner an ein chromatographisches Sorbens als Träger fixiert, an den dann die spezifisch passende Komponente bindet. Anschließend wird mit verändertem pH, anderer Ionenstärke oder z.B. Analogen der passenden Komponente eluiert. Umfaßt ist damit auch die kovalente Chromatographie z.B. über Bildung von Disulfid-Brücken und die hydrophobe Chromatographie, bei der hydrophobe Wechselwirkungen ausgenutzt werden.

25

Insbesondere kann die insertierte Aminosäure aus folgender Gruppe ausgewählt sein: einem Liganden eines Rezeptors oder dem Rezeptor eines Liganden, einem

Antikörper oder Teil eines Antikörpers, insbesondere einem Antikörper-Epitop, einem Antigen oder Antigen-Epitop, einem Hormon, einem Hormorezeptor, einem Enzym, einem Enzymsubstrat, einem Lektin und/oder einer zucker-tragenden Aminosäure.

5

Vorzugsweise können dies sein:

- ein Histidin-reiches Peptid (His-TAG), das eine Aufreinigung über ein Metall-Chelat-Affinitätsmedium ermöglicht;
- ein Peptid mit mehreren Ladungen, das das Bindungs- bzw. Elutionsverhalten während einer Ionenaustauschchromatographie verändert und so einen derartigen Reinigungsschritt spezifischer oder effizienter gestaltet;
- die Glutathion-S-Transferase (GST-Tag), das eine Aufreinigung über ein Glutathion-Affinitätsmedium ermöglicht;
- ein F<sub>c</sub>-Teil eines Antikörpers, der eine Aufreinigung über ein Protein A- oder Protein G-Affinitätsmedium ermöglicht;
- eine Immunglobulin-bindende Domäne, beispielsweise Protein A oder Protein G bzw. Teile davon, das eine Aufreinigung über ein Affinitätsmedium mit einem Antikörper oder einem F<sub>c</sub>-Teil eines Antikörpers ermöglicht;
- ein bestimmtes Antikörper-Epitop, das eine Aufreinigung über ein Medium mit gekoppelten Antikörpern ermöglicht, die für das Epitop spezifisch sind;
- ein Lecitin, das eine Aufreinigung über ein Glycoprotein-Medium ermöglicht;
- eine Nukleinsäure-Bindestelle, die eine Aufreinigung über Nukleinsäure-Medien ermöglicht;
- eine Heparin-Bindestelle, die eine Aufreinigung über ein Heparin-Medium ermöglicht, wobei eine intrinsische Heparin-Bindungsstelle in Wildtyp-AAV bereits vorhanden ist, so daß eine zusätzliche Bindungsstelle die Bindung lediglich verstärken würde;

25

- Streptavidin, das eine Aufreinigung über Biotin oder biotinylierte Proteine ermöglicht:
- ein bestimmter Ligand, der eine Aufreinigung über ein Medium mit dem entsprechenden Rezeptor ermöglicht oder
- 5 • ein bestimmter Rezeptor, der eine Aufreinigung über ein Medium mit dem entsprechenden Liganden ermöglicht.

Ebenfalls bevorzugt sind ein Integrin, ein Cytokin oder eine Rezeptor-Bindungsdomäne von einem Cytokin, Integrin oder Wachstumsfaktor, an einem  
10 Zelloberflächenrezeptor bindende einzelkettige Antikörper, ein Antikörper gegen Zelloberflächenstrukturen, ein Epitop und/oder eine antikörperbindende Struktur.

In einer bevorzugten Ausführung wird ein Peptid mit beispielsweise 5 bis 30 Aminosäuren, vorzugsweise 8 bis 20 Aminosäuren und insbesondere 10 bis 18 Amino-  
15 säuren insertiert. Das Peptid hat beispielsweise die Sequenz QAGTFALRGDNPQG oder eine Sequenz, die zu dieser stark homolog ist. Bei diesem besonders bevorzugten Liganden handelt es sich um das P1-Peptid, das ein 14 Aminosäuren langes Peptid aus der Core-Sequenz einer Alpha-Kette der Laminin-Familie darstellt. Diese Sequenz ist beispielsweise ausreichend, um einen Integrin-Rezeptor zu erkennen, der  
20 u.a. die Endozytose viraler Partikel, z.B. von Adenovirus, vermittelt. Das P1-Peptid bindet unabhängig von seiner Konformation (linear oder zirkulär) an den Integrin-Rezeptor. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird die kodierende DNA-Sequenz des P1-Peptids in das Gen kodierend für ein Strukturprotein von AAV, welches beispielsweise auf einem Helferplasmid liegt, eingebaut. Nach der Verpackung mit dem  
25 mutanten Helferplasmid erhält man rekombinantes AAV mit P1 im Kapsid (rAAV-P1). Für die Insertion dieses Peptids konnte gezeigt werden, daß diese AAV-Partikel im Vergleich zu unmodifizierten AAV-Partikeln bereits bei niedrigerer Leitfähigkeit von einem Kationenaustauscher eluieren und so, je nach Bedingungen, eine verbesserte Trennung (z.B. vom Wildtyp) und Aufreinigung erlauben.

Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Strukturprotein, das mindestens eine weitere Mutation enthält. Darunter ist zu verstehen, daß das Strukturprotein neben einer Mutation, die eine Veränderung der chromatographischen Eigenschaften des Virus bewirkt, auch eine weitere Mutation enthält, die nicht zwangs-  
5 läufig auch eine Veränderung der chromatographischen Eigenschaften des Virus bewirkt. Besonders bevorzugt ist hier eine weitere Mutation, die eine Änderung, vorzugsweise Erhöhung, der Infektiosität des Virus bewirkt.

- 10 Ein weiterer bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Strukturprotein von AAV, bei dem die weitere(n) Mutation(en) eine Verringerung der Antigenität bewirkt (bewirken).

Unter Antigenität versteht man im Sinne dieser Erfindung die Auslösung sowohl  
15 einer Antikörperbildung als auch –bindung aufgrund des Immunsystems. Der Begriff umfaßt auch die Immunogenität, also die Auslösung einer Immunantwort. Unter der Verringerung der Antigenität versteht man daher die Verringerung der Antikörperbildung und –bindung sowohl durch Verringerung der antigenen Epitope, als auch durch Verringerung der antigenen Wirkung bestimmter Epitope  
20 oder durch Veränderung und Entfernung bestimmter im Wildtyp vorhandener Epitope. Die veränderte Antigenität kann sich dabei sowohl auf die humorale wie auch die zelluläre Immunantwort beziehen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt/stellen die weiteren Mutati-  
25 on/en eine oder mehrere Deletionen und/oder eine oder mehrere Insertionen im Strukturprotein oder Kombinationen der genannten Modifikationen dar. Dabei ist die Insertion vorzugsweise die Insertion eines Zellmembranrezeptor-Liganden, eines Rep-Proteins oder -Peptids, beispielsweise in Form einer Rep-Domäne, eines immunsuppressiven Proteins oder Peptids und/oder eines Proteins oder Pep-

tids mit einem Signal zur Doppelstrangsynthese eines Transgens bzw. Fremdgens. Bevorzugt ist hierbei beispielsweise das P1-Peptid (QAGTFALRGDNPQG) (s.o).

Beispiele von Insertionen bei der weiteren Mutation sind u.a. Integrine, Cytokine  
5 oder Rezeptor-Bindungsdomänen von Cytokinen, Integrinen oder Wachstums-  
faktoren, wie z.B. GM-CSF, IL-2, IL-12, CD40L, TNF, NGF, PDGF oder EGF,  
an Zelloberflächenrezeptoren bindende einzelkettige Antikörper, sog. "single  
chain" Antikörper (scFv), beispielsweise an die Oberflächenrezeptoren CD40,  
CD40L, B7, CD28 oder CD34 bindende einzelkettige Antikörper, oder Epitope  
10 bzw. Rezeptorbindungsstellen, die beispielsweise ihrerseits von bestimmten Anti-  
körpern, beispielsweise Anti-CD40L-monoklonale Antikörper, bzw. von chemi-  
schen Substanzen oder Hormonen, z.B. Katecholamine, erkannt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der weiteren Mutation werden antikörper-  
15 bindende Strukturen, wie z.B. Protein A, Protein G oder anti-Fc-Antikörper, bzw.  
Teile hiervon, inseriert. An diese werden wiederum spezifische Antikörper gegen  
bestimmte Zelloberflächenstrukturen (beispielsweise gegen das CD40 bei lymphati-  
schen Zellen oder gegen das CD34 bei hämatopoietische Zellen) angekoppelt.

20 Vorzugsweise ist/sind die Mutation/en an der Virusoberfläche lokalisiert. Zur Be-  
stimmung der oberflächen-lokalisierten Bereiche der Strukturproteine wurde gemäß  
der vorliegenden Erfindung überraschenderweise gefunden, daß CPV- und AAV2-  
Sequenzen und -Strukturen vergleichbar sind. Man kann daher vorzugsweise auf  
bekannte Kristallstrukturen von Parvoviren wie von Parvovirus B19 oder von CPV  
25 (Canine-Parvovirus) zurückgreifen und mit Hilfe von Homologievergleichen Prote-  
indomänen identifizieren, die auf der Virusoberfläche lokalisiert sind. Gemäß der  
vorliegenden Erfindung hat daher beispielsweise ein computerunterstützter Ver-  
gleich zwischen CPV und AAV2 bzw. Parvovirus B19 und AAV2 überraschender-  
weise reproduzierbar zur Identifikation von Schleifen (Loops) in VP3 geführt, deren

Sequenz variiert, d.h. die eine geringe Homologie besitzen und die voraussichtlich auf der Virusoberfläche lokalisiert sind. Da die Antigene für die humorale Immunantwort für Antikörper zugänglich und somit auf der Virusoberfläche sein müssen, stellen diese Schleifen bevorzugte Kandidaten für Mutationen dar. So wurde die  
5 bekannte Kristallstruktur des CPV VP2-Kapsid-Proteins (z.B. Luo M.(1988), J. Mol. Biol., 200, 209-211; Wu und Rossmann (1993), J.Mol.Biol., 233, 231-244) aufgrund der hohen Ähnlichkeit zum AAV2 VP3 in der sekundären Struktur des Proteins als Muster genommen, um die Regionen herauszufinden, die auf der viralen Kapsidoberfläche exponiert sind und die aufgrund der lokalen Aminosäure-  
10 sequenz flexibel genug sind, beispielsweise die Insertion einer Peptidsequenz zu überstehen. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, daß keine sekundären Strukturelemente des AAV2-Kapsidproteins ausgewählt wurden, die das Kapsid destabilisieren würden.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Mutation(en) am N-Terminus des Strukturproteins lokalisiert, da gefunden wurde, daß beispielsweise bei den Parvoviren CPV und B19 der N-Terminus an der Zelloberfläche liegt.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Oberflächen-lokalisierten Bereiche  
20 der Strukturproteine ist ein Vergleich der für die Kapside kodierenden Nukleinsäuresequenzen von unterschiedlichen AAV-Serotypen. Hierzu können beispielsweise bekannte DNA-Sequenzen unterschiedlicher AAV-Serotypen, wie AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 oder AAV6, für Strukturanalysen möglicher Kapsidmorphologien von beispielsweise AAV2 herangezogen werden, wobei ab initio mögliche  
25 Tertiärstrukturen berechnet und Sequenzbereiche aufgrund allgemein bekannter Aminosäure-Eigenschaften den inneren oder äußeren Kapsidbereichen zugeordnet werden können. So konnten beispielsweise gemäß der vorliegenden Erfindung mögliche Insertionsstellen im VP3-Bereich des AAV2-Kapsids ermittelt werden, die die Insertion beispielsweise von Peptiden und deren Expression auf der Virusoberfläche  
30 ermöglichen (siehe unten).

- In einer bevorzugten Ausführungsform wird (werden) die Mutation(en) durch eine oder mehrere Insertionen an den XhoI-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure und in einer anderen bevorzugten Ausführungsform an der BsrBI-Schnittstelle der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Strukturproteins entsteht durch eine Deletion zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure und eine oder mehrere Insertionen, vorzugsweise an der Stelle der Deletion.
- 10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird (werden) die Mutation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den XhoI-XhoI-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure, die 62 Aminosäuren umfaßt (Hermonat, P. L. et al. (1984), J. Virol., 51, 329-339) bewirkt. In einer weiteren bevorzugten und entsprechenden Ausführungsform liegt die Deletion(en) zwischen den
- 15 BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure, die innerhalb der oben beschriebenen Deletion liegt und 29 Aminosäuren umfaßt. Diese Deletion hat den Vorteil, daß sie keine Überlappung mit dem rep-Gen hat und daher den Verpackungsmechanismus im wesentlichen nicht beeinflußt.
- 20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform liegen ein oder mehrere Insertionen im VP3-Strukturprotein (Rutledge, E. A. et al. (1998) supra) vor und/oder nach mindestens einer Aminosäure in der Sequenz ausgewählt aus YKQIS SQSGA, YLTLN NGSQA, YYLSR TNTPS, EEKFF PQSGV, NPVAT, EQYGS, LQRGN RQAAT, NVDFT VDTNG, da diese Stellen an den exponierten Stellen eines Loops liegen,
- 25 wobei das Risiko gering ist, die VP3-Struktur zu ändern.

Die Punktmutation(en), die Mutation(en) mehrerer Aminosäuren, die Deletion(en) oder Insertion(en) wird/werden nach allgemein bekannten Methoden durch Deletion und Insertion in dem für das Strukturprotein codierenden Gen durchgeführt. Die

Deletionen lassen sich beispielsweise mittels PCR-unterstützter Mutagenese in die einzelnen Strukturprotein-Gene einführen. Die Insertionen lassen sich nach allgemein bekannten Methoden beispielsweise mittels Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen der entsprechenden Strukturprotein-Gene und anschließender  
5 Ligasereaktion einfügen. Die anschließende Expression des mutierten Gens führt zum erfindungsgemäßen Strukturprotein.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein erfindungsgemäßes Strukturprotein in Form eines AAV-Partikels, insbesondere in Form eines  
10 AAV-Kapsids, da Partikel bzw. Kapside als Träger von ausgewählten Verbindungen, z.B. rAAV-Transduktionsvektoren, besonders geeignet sind.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind eine Nukleinsäure, vorzugsweise eine RNA oder DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA, kodierend für  
15 ein erfindungsgemäßes Strukturprotein.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf eine Zelle, vorzugsweise eine Säugtierzelle, beispielsweise eine COS-Zelle, HeLa-Zelle oder 293-Zelle, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure. Derartige Zellen eignen sich beispielsweise  
20 zur Herstellung der rekombinanten AAV-Partikel.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Strukturproteins, insbesondere zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Strukturproteins in Form eines AAV-Partikels,  
25 wobei eine geeignete Zelle, enthaltend eine Nukleinsäure, kodierend für das erfindungsgemäße Strukturprotein kultiviert und ggf. das exprimierte Strukturprotein isoliert wird. Beispielsweise läßt sich das erfindungsgemäße Strukturprotein chromatographisch reinigen und isolieren.



Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf ein Arzneimittel, enthaltend ein erfindungsgemäßes Strukturprotein, eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder eine erfindungsgemäße Zelle und ggf. geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe, wie z.B. eine physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinase-, DNase-Inhibitoren, etc.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf die Verwendung des erfindungsgemäßen Strukturproteins, einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. einer erfindungsgemäßen Zelle für die Aufreinigung von AAV und AAV-Partikeln, für die Änderung des Tropismus von AAV, für die Änderung der Antigenität von AAV, für die Transformation einer Zelle, insbesondere einer Zelle, die vorher einer AAV-Infektion wenig zugänglich war, wie beispielsweise einer hämatopoetischen Zelle, für das genomische Targeting, für die Diagnostik, für Wirksamkeitsuntersuchungen und/oder - in Form von geeigneten rAAV-Vektoren - für die Gentherapie. Unter Gentherapie versteht man eine Therapieform, bei der durch die Einführung von Nukleinsäuren in Zellen ein Effektorgen, meist ein Protein, exprimiert wird. Man unterscheidet prinzipiell *In-vitro*- und *In-vivo*-Verfahren. In *In-vitro*-Verfahren werden Zellen aus dem Organismus entfernt und *ex-vivo* mit Vektoren transduziert, um anschließend wieder in denselben oder in einen anderen Organismus eingebracht zu werden. Bei der *In-vivo*-Gentherapie werden Vektoren, beispielsweise zur Bekämpfung von Tumoren, systemisch (z.B. über die Blutbahn) oder direkt in den Tumor, das Gewebe oder die Organe appliziert.

Ein wesentlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, daß durch die erfindungsgemäße Mutagenese von Strukturproteinen von AAV über die Veränderung der chromatographischen Eigenschaften neue Möglichkeiten für spezifischere Aufreinigungsverfahren im wesentlichen ohne Verlust der Verpackungseffizienz rekombinanter AAV-Vektoren in das Kapsid des Virus geschaffen werden können. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, AAV oder AAV-Partikel zu höheren Titern

und/oder größerer Reinheit aufzureinigen und die Reinigung effizienter und kostengünstiger zu gestalten. Dies wiederum ermöglicht die großtechnische Anwendung von rekombinanten AAV für Zelltransformationen und Gentherapien im kommerziellen Maßstab.

5

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

#### Beschreibung der Figuren

10

Figur 1 zeigt das Chromatogramm für eine Wildtyp-AAV-Probe in einem Lauf über eine POROS 50HS Kationenaustauschsäule. Aufgetragen ist das Durchflußvolumen gegen die Leitfähigkeit (linke y-Achse) und gegen die Absorption bei 280 nm (rechte y-Achse). Die AAV-Partikel eluierten in den Fraktionen 12 und 13, was im  
15 Mittel einer Leitfähigkeit von 30 mS/cm (300 mM NaCl) entspricht (siehe dicker horizontaler Strich).

Figur 2 zeigt das Chromatogramm für eine AAV-Probe bestehend aus mutierten AAV-Partikeln (Insertion des Peptids QAGTFALRGDNPQG nach Aminosäure  
20 587; I-587 gemäß Beispiel 3) in einem Lauf über eine POROS 50HS Kationenaustauschsäule. Aufgetragen ist das Durchflußvolumen gegen die Leitfähigkeit (linke y-Achse) und gegen die Absorption bei 280 nm (rechte y-Achse). Die modifizierten AAV-Partikel eluierten in den Fraktionen 6 und 7, was im Mittel einer Leitfähigkeit von 22 mS/cm (220 mM NaCl) entspricht (siehe dicker horizontaler  
25 Strich).

## Beispiele

### Beispiel 1:

Mittels PCR-unterstützter Mutagenese und Schneiden mit den Restriktionsenzymen

5 XhoI, BsrBI bzw. HindIII wurden folgende Mutationen hergestellt:

### Mutationen im VP1

10 a) Deletion zwischen den XhoI-XhoI-Schnittstellen des VP-1 ( $\Delta$ Xho;  
62 Aminosäuren, AS) (Hermonat et al. (1984) Journal of Virology 51, 329  
- 339),

b) Deletion zwischen BsrBI und HindII-Schnittstellen des VP-1, die  
innerhalb von der obigen Deletion a) liegt und 29 AS umfaßt ( $\Delta$ BH);

15 c) Deletion zwischen BsrBI und HindII, sowie Insertion eines Liganden  
(P1-Peptid) ( $\Delta$ BH+L); und

d) Reine Insertion des Liganden (P1-Peptid) an der BsrBI-Schnittstelle  
(B+L).

### 20 Mutationen im VP3

a) ins261; YKQIS SQSGA

b) ins381; YLTLN NGSQA

c) ins447; YYLSR TNTPS

25 d) ins534; EEKFF PQSGV

- 18 -

- e) ins573; NPVAT EQYGS
- f) ins587; LQRGN RQAAT
- g) ins713; NVDFT VDTNG

- 5 (Nomenklatur nach Zahl der Aminosäuren (AS) gezählt nach den AS ab Beginn des N-Terminus im VP-1 von AAV2, umrahmt von jeweils 5 N-terminal davon gelegenen und 5 C-terminal davon gelegenen Aminosäuren; die AS, nach der die Insertion eingebracht wurde, ist in Fettschrift dargestellt).
- 10 Es ist auch möglich, daß in die fünf unmittelbar benachbarten AS, die neben der fett markierten AS liegen, ebenfalls eine Insertion eingebracht wird, da diese ebenfalls innerhalb eines Loops im AAV2-Kapsid liegen.

#### Beispiel 2:

- 15 Charakterisierung der Kapsidmutanten

- 20 Nach Durchführung der Mutationen im AAV2-Genom und Verpackung der mutierten Viren mit LacZ-Reportergen wurden die physikalischen Vektor-Titer durch Dot-Blot und Kapsid-Titer mit A20-Antikörper-ELISA bestimmt und erste Infektionstests auf HeLa-Zellen durchgeführt. Dadurch konnte bestimmt werden, ob die Mutationen die Struktur der VP-Proteine oder die Interaktion zwischen verschiedenen VP-Proteinen so stören, daß eine Verpackung unterbleibt bzw. gestört wird (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verpackungseffizienz der hergestellten Virusmutanten

Virusstock	genomische Virustiter	Kapsid-Titer (ELISA mit A20-MAb)
Wildtyp-Kapsid	$1 \cdot 10^{12}$	$1 \cdot 10^{11}$
VP1-Mutanten		
$\Delta xho$	$6 \cdot 10^{12}$	$5 \cdot 10^{10}$
$\Delta BH$	$8 \cdot 10^{11}$	$4 \cdot 10^9$
$\Delta BH+L$	$1 \cdot 10^{13}$	$5 \cdot 10^{10}$
B+L	$3 \cdot 10^{12}$	$5 \cdot 10^9$
VP3-Mutanten		
ins261	$1 \cdot 10^{10}$	$< 10^8$
ins381	$3 \cdot 10^{10}$	$< 10^8$
ins447	$1 \cdot 10^{12}$	$4 \cdot 10^{10}$
ins534	$1 \cdot 10^{10}$	$< 10^8$
ins573	$3 \cdot 10^{10}$	$< 10^8$
ins587	$1 \cdot 10^{12}$	$2 \cdot 10^{10}$
ins713	$5 \cdot 10^{10}$	$< 10^8$

Gezeigt sind die genomischen Virustiter (Dot-Blot) und Kapsid-Titer (A20-Kapsid-ELISA). Die Konzentrationen sind in Partikel/ml angegeben.

Für alle 4 VP1-Mutanten konnte gezeigt werden, daß Mutationen die Verpackungseffizienz nicht beeinflussen und alle mutierten Viren mit ähnlichen guten Titern wie Vektoren mit unmutiertem Kapsid verpackt werden können ( $10^{11}$  bis  $10^{13}$  genomische Partikel/ml). Auch die AAV-Vektoren mit Mutationen im VP3-Bereich konnten erfolgreich verpackt werden ( $10^{10}$ - $10^{12}$  genomische Partikel/ml).

### Beispiel 3

#### 10 P1-Mutation in VP3

Zunächst wurde von einem Plasmid pUC-AV2, das durch Subklonierung des 4.8-kb BglII-Fragments des pAV2 (ATCC 37261, ref. 53) in die BamHI Schnittstelle des pUC19 (New England BioLabs Inc.) hergestellt wurde, ausgegangen. Mittels dem Fachmann bekannter PCR-unterstützter Mutagenese wurden an definierten Stellen des Plasmids Mutationen vorgenommen. Dabei wurde eine für P1, ein 14-AS-Peptid, mit der AS-Sequenz QAGTFALRGDNPQG, das das RGD-Bindungsmotiv eines Lamininfragments (Aumailly et al. (1990) FEBS Lett. 262, 82-86) enthält, codierende Sequenz nach den Nukleotiden 2985, 3543 und 3963 eingefügt. Dies entspricht einer Insertion nach den Aminosäuren 261, 447 und 587 des AAV2-Kapsidproteins (Nomenklatur nach Zahl der Aminosäuren (AS) gezählt nach den AS ab Beginn des N-Terminus im VP-1 von AAV2). In der anschließenden PCR werden jeweils 2 mutationsspezifische Primer und als Matrize ein Plasmid, pCap verwendet, das nur das cap-Gen enthält und dadurch gebildet wird, daß das 2.2 kb EcoRI-BspMI-Fragment aus pUC-Av2 herausgeschnitten und in die EcoRI-Schnittstelle des pUC19 eingefügt wird. Anschließend werden die PCR Produkte in Bakterien amplifiziert, sequenziert und das 1.4-kb EcoNI-XcmI-Fragment, das P1 enthält in pUC-AV2, in dem die korrespondierende Wildtyp-cap-Sequenz herausgeschnitten wurde, subkloniert. Dementsprechend enthielten die nach den AS-Insertionsstellen pI-261, pI-381, pI-447 und pI-587 genannten

Plasmide (Mutanten) das komplette AAV2-Genom. Die entsprechenden mutierten Proteine werden mit I-261, I-381, I-447 und I-587 bezeichnet.

#### Beispiel 4

##### 5 Herstellung von AAV2-Partikeln

HeLa-Zellen (eine humane Cervix-Epithel-Zelllinie) wurden mit den Plasmiden gemäß Beispiel 1 transfiziert, dann ca. 20h inkubiert und anschließend mit Adenovirus Typ 5 infiziert. 72 h nach der Infektion wurden die Zellen aufgeschlossen und die  
10 AAV2-Partikel über einen CsCl-Gradienten gereinigt.

#### Beispiel 5

##### Charakterisierung der Kapsidmutanten gemäß Beispiel 3

15 In diesen Versuchen sollte festgestellt werden, ob die Kapsidmutanten das virale Genom verpacken und vollständige Kapside bilden können. AAV2-Partikel der Mutanten gemäß Beispiel 4 wurden darauf überprüft, ob und wenn ja wieviele Partikel das Virus-Genom tragen und wieviel DNA in den Kapsid-Mutanten verpackt war. Dazu wurden die gemäß Beispiel 4 gereinigten Viruspartikel (Mutanten und Wildtyp) mit DNase behandelt, geblottet und mit einer Rep-Sonde hybridisiert.  
20

Der sich daraus ergebende Titer zeigte keine quantitative oder qualitative Differenz im Vergleich zum Wildtyp (s. Tabelle 2). Die Viren behielten die Fähigkeit,  
25 das Genom zu verpacken.

Durch Elektronenmikroskopanalyse konnte weiter bestätigt werden, daß auch das Kapsid ausgebildet wird.

Daher wurden die Mutationen nicht in Bereichen vorgenommen, die für die korrekte Faltung, die Kapsid-Zusammensetzung oder die Verpackung des Genoms von Bedeutung sind. Die erfindungsgemäßen AAV-Partikel sind in ihrer Funktion ungestört.

5

Um ablesen zu können, ob die mutierten Kapside vollständig gebildet werden und keine veränderte Antigenität zeigen, wurden in einem weiteren Experiment A20 monoklonale Antikörper (A20-MAb) in einem ELISA eingesetzt. A20-MAb reagieren spezifisch mit komplett zusammengesetztem AAV2-Kapsid des Wildtyps (Wistuba et al., (1997), J. Virol. 71, 1341-1352). Auch hier sind die Ergebnisse in  
 10 Tabelle 2 dargestellt. Dabei zeigt sich, daß durch die Insertion in den Mutanten I-447 und I-587 die Kapsid-Bildung nicht gestört wird, während bei I-261 der A20 monoklonale Antikörper nicht mehr bindet, was aber, da sich die Kapside nach Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop trotzdem bilden, auf eine Ver-  
 15 änderung der Antigenität zurückzuführen ist.

Tabelle 2 Verpackungseffizienz und Antigenität der hergestellten Virusmutanten gemäß Beispiel 3

Virusstock	genomische Virustiter	ELISA mit A20-MAb
Wildtyp-Kapsid	$8 \cdot 10^{13}$	$6 \cdot 10^{12}$
Mutanten		
I-261	$1 \cdot 10^{12}$	n.m.
I-381	$1 \cdot 10^{12}$	n.m.
I-447	$1 \cdot 10^{13}$	$8 \cdot 10^{11}$
I-587	$4 \cdot 10^{13}$	$3 \cdot 10^{12}$



Gezeigt sind die genomischen Virustiter (Dot-Blot) und der Titer mit A20-Kapsid-ELISA. Die Konzentrationen sind in Partikel/ml angegeben. „n.m.“ heißt „nicht meßbar“.

5 Beispiel 6:

Verändertes Elutionsverhalten der Kapsidmutanten

Rekombinante Wildtyp-AAV (in 20 mM Hepes pH 6.8, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) wurden auf eine 0,8 ml POROS 20HS Kationenaustauschersäule (Perkin-  
10 Elmer, Weiterstadt) geladen. Es wurde mit Hilfe eines Äkta-Systems (Pharmacia) ein Gradient von 30 Säulenvolumina von 100 bis 700 mM NaCl in 20 mM Hepes 6,8 angelegt. Gemäß Western Blot Analyse eluierte AAV in den Fraktionen 12 und 13, was einer Elution von Wildtyp-AAV bei 30 mS/cm (=ca. 300 mM NaCl) entspricht (siehe Fig. 1).

15

Eine Kapsidmutante (I-587 gem. Beispiel 3) von AAV (das P1-Peptid QAGTFALRGDNPQG ist inseriert nach Aminosäure 587; in PBS, pH 6,8) wurde auf dieselbe 0,8 ml POROS 20HS Kationenaustauschersäule (siehe oben) aufgetragen. Es wurde in einem Äkta-System mit einem Gradienten von 30 Säulenvo-  
20 lumina 50-1000 mM NaCl in 20 mM Hepes pH 6,8 eluiert. Die AAV-Mutante befand sich gemäß Western Blot Analyse in den Fraktionen 6 und 7. Dies entspricht einer Elution von ca. 22 ms/cm (= ca. 220 mM NaCl) (siehe Fig. 2).

Dies zeigt, daß durch die Insertion des QAGTFALRGDNPQG-Peptids sich das  
25 Elutionsverhalten der AAV-Partikel ändert, so daß bei gleichem pH Wert die mutierten Partikel bei einer geringeren Salzkonzentration eluieren als die Wildtyp-Partikel. Damit wird die Virusfraktion zu anderen, unter Umständen weniger unreinigten bzw. sonst geeigneteren Fraktionen hin verschoben. Daher ist es

möglich, durch Insertionen, Deletionen oder sonstige Veränderungen der Kapsidproteine die chromatographischen Eigenschaften der AAV-Partikel zu ändern. Insbesondere können in einer Variante der gezeigten Insertion durch Einfügen von Aminosäuren mit überwiegend positiver Ladung, beispielsweise an den  
5 in den Beispielen gezeigten Insertionsstellen, erfindungsgemäße Kapsid-Mutanten konstruiert werden, die im Vergleich zum Wildtyp (der in einem breiten, weniger verunreinigten Peak eluiert) bei höheren Salzkonzentrationen eluieren. Die Affinität der Mutante zum Säulenmaterial ist dadurch verstärkt, so daß die Elution erst bei hohen Salzkonzentrationen erfolgt, also in Bereichen, die üblicherweise weniger  
10 durch kleinere Fremdproteine verunreinigt sind.

Beispiel 7:

Infektionstests mit Mutanten gemäß Beispiel 3

15 Um den Tropismus der Kapsidmutanten I-261, I-381, I-447 und I-587 zu testen, wurden Zelllinien, Co-115 und B16F10, mit den mutierten Viren infiziert. Co-115-Zellen wurden zum Testen des Wildtyprezeptor-Tropismus der Virionen verwendet, da diese mit Wildtyp AAV2 transduziert werden können und das P1-Peptid nicht binden. Die B16F10-Zelllinie wurde aus den in Beispiel 9 bereits genannten  
20 Gründen verwendet. Drei Tage nach der Infektion wurden die Zellen durch Immunofluoreszenzmessung mit Hilfe eines anti-Rep-Antikörpers darauf untersucht, ob das virale Rep-Protein exprimiert wird (Wistuba et al. (1997) J. Virol. 71, 1341-1352; Wistuba et al. (1995) J. Virol. 69, 5311-5319). Zellen wurden auf Objektträgern zu 70 % Konfluenz gezüchtet und mit verschiedenen Konzentrationen  
25 erfindungsgemäßer viraler Präparationen in serumfreiem Medium zusammen mit Adenovirus 5 inkubiert. Die Titer der viralen Präparationen wurden drei Tage später durch in-situ-Detektion der Rep-Proteinsynthese in einem Immunofluoreszenzassay (Rep-Titer) bestimmt. Dabei wurde die Immunofluoreszenzanfärbung mit AAV2-infizierten Zellen nach einer Methode von Wistuba et al. (Wistuba et al. (1997) J. Virol. 71, 1341-1352; Wistuba et al. (1995) J. Virol. 69, 5311-5319)  
30

durchgeführt. Die Objektträger wurden einmal mit PBS gewaschen, in Methanol (5 min, 4°C) fixiert und anschließend mit Aceton (5 min, 4°C) behandelt. Die Zellen wurden dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen Antikörper 76-3, der mit Rep-Proteinen von AAV2 reagiert, inkubiert. Anschließend wurde gewaschen und für eine Stunde mit einem Rhodamin-konjugierten Anti-Maus-sekundären Antikörper bei einer Verdünnung von 1:50 in PBS mit 1% BSA inkubiert. Die Titer wurden aus der letzten limitierenden Verdünnung der viralen Stammlösung errechnet, die zu fluoreszenzpositiven Zellen geführt hatten.

Rep-positive CO115-Zellen konnten nach Infektion mit Wildtyp AAV2 und mit Mutanten I-261, I-447 und I-587 detektiert werden. Bei Co115-Zellen war die Infektiosität von I-261, I-587 und I-447 um zwei bis drei Größenordnungen kleiner als die des Wildtyps (Tabelle 3). Die Transfektion von B16F10-Zellen war mit I-447 genauso ineffektiv wie die mit Wildtypvirus (Tabelle 3). In klarem Gegensatz dazu sind nach Infektion mit I-587 Rep-positive B16F10-Zellen feststellbar, wobei der Titer des I-587-Virus auf  $1 \times 10^6$  Rep-EFU/ml bestimmt wurde (Tabelle 3).

Um zu untersuchen, ob die Transfektion von B16F10-Zellen durch die Mutante I-587 spezifisch durch die Interaktion zwischen der P1-Sequenz auf der Oberfläche des mutierten Kapsids und dem Integrinrezeptor auf der Oberfläche der B16F10-Zellen vermittelt wurde, wurden die Zellen entweder mit dem konkurrierenden RGDS oder dem inaktiven RGEs-Peptid bei Konzentrationen von 200  $\mu$ mol vor der Infektion mit dem Virus inkubiert. Die Zugabe von RGDS-Peptid neutralisierte die Infektiosität von I-587 auf B16F10-Zellen (Tabelle 3), während das Kontrollpeptid RGEs keinen Effekt hatte.

Tabelle 3: Virustiter auf der Zelloberfläche

Virusstock	Titer auf CO115-Zellen	Titer auf B16F10-Zellen	
		- RGDS	+ RGDS
Wildtyp-Kapsid	$2 \cdot 10^9$	<1	nb
Mutanten			
I-261	$7 \cdot 10^6$	nb	nb
I-381	n.m.	nb	nb
I-447	$1 \cdot 10^6$	<1	nb
I-587	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	<1
rAAV/LacZ	$5 \cdot 10^7$	<1	nb
rAAV(I-587)/LacZ	$6 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	<1

Gezeigt sind die Titer auf den wildtypanfälligen CO115-Zellen und den wildtypresistenten B16F10-Zellen. Die Titer sind für I-447 und I-587 wie den Wildtyp in Rep-  
 5 EFU/ml und für rAAV/LacZ und rAAV(I-587)/LacZ in LacZ-EFU/ml ausgedrückt.  
 Dabei bedeutet EFU expressionsbildende Einheiten (Expressing Forming Unit) und nb heißt „nicht bestimmt“. „n.m.“ heißt „nicht meßbar“.

## Beispiel 8:

10 Infektionsassay der Mutanten gemäß Beispiel 3 mit Galaktosidase

In einem weiteren an Beispiel 6 angelehnten Versuch wurden rAAV-Vektoren mit einem LacZ-Reportergen hergestellt, die entweder den Wildtyp (rAAV-Virion) oder I-587 (rAAV(I-587)-Virion) enthielten. Die Viralpräparationen wurden  
 15 rAAV/LacZ und rAAV(I-587)/LacZ genannt und zur Infektion von B16F10- bzw. CO115-Zellen (Kontrollen) verwendet.

Infizierte Zellen wurden drei Tage nach der Infektion durch X-Gal-Anfärbung auf  $\beta$ -Galaktosidase-Expression getestet. Dabei wurde der X-Gal-in-situ-Test zur zytochemischen Anfärbung (LacZ-Titer) verwendet. Nach diesem wurden die Zellen, um die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase zu testen, einmal in PBS gewaschen und dann mit 1,5 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) behandelt, wie bereits von Chiorini et al. (1995) Hum. Gen. Ther. 6, 1531-1541, beschrieben. Die Titer wurden aus der letzten limitierenden Verdünnung der viralen Stammlösung errechnet, die zu  $\beta$ -Galaktosidase-produzierenden Zellen geführt hatte.

10

Bei den Kontrollen an CO115-Zellen waren beide Virionen infektiös, allerdings rAAV (I-587)/LacZ um 2 Größenordnungen weniger effektiv. Bei Typ B16F10 wurden – wie erwartet – nach der Infektion mit rAAV/LacZ keine  $\beta$ -Galaktosidase-positiven Zellen gefunden. Nach der Infektion mit rAAV(I-587)/LacZ hingegen fanden sich überraschenderweise deutlich viele  $\beta$ -Galaktosidase-positive Zellen. Der Titer von rAAV-(I-587)/LacZ wurde mit  $5 \times 10^4$  LacZ-EFU pro ml bestimmt. Die Infektiosität von rAAV-Vektoren gegenüber B16F10-Zellen wurde durch die erfindungsgemäße Mutation um mehr als vier Größenordnungen verbessert (Tabelle 3).

20

## PATENTANSPRÜCHE

5

1. Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus (AAV), dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturprotein mindestens eine Mutation enthält, die eine Änderung der chromatographischen Eigenschaften des Virus bewirkt.

10

2. Strukturprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Änderung der chromatographischen Eigenschaften eine Verbesserung der Aufreinigung ermöglicht, insbesondere eine Anreicherung des Virus, vorzugsweise der Virus-Partikel, zu höheren Titern, eine Aufreinigung zu größerer Reinheit und/oder eine effizientere Aufreinigung.

15

3. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation keine wesentliche Verringerung der Infektiosität des Virus bewirkt.

20

4. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation auch eine Erhöhung der Infektiosität des Virus bewirkt.

25

5. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das mutierte Strukturprotein zur Partikelbildung befähigt ist.

6. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das mutierte Strukturprotein die Hitzestabilität erhöht.
7. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es ausgewählt ist aus mutiertem VP1, mutiertem VP2 und/oder mutiertem VP3.
8. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es abgeleitet ist von AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV 5 und/oder AAV6 sowie anderen von diesen, insbesondere von AAV2, abgeleiteten AAV-Serotypen.
9. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation eine Punktmutation, eine Mutation mehrerer Aminosäuren, eine oder mehrere Deletion(en), insbesondere eine oder mehrere Insertion(en) oder eine Kombinationen der genannten Modifikationen ist.
10. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß Aminosäuren einer funktionellen Sequenz insertiert werden, die vorzugsweise für die Affinitätschromatographie geeignet sind.
11. Strukturprotein nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die insertierte Aminosäuresequenz ausgewählt ist aus einem Liganden eines Rezeptors oder dem Rezeptor eines Liganden, einem Antikörper oder Teil eines Antikörpers, insbesondere einem Antikörper-Epitop, einem Antigen oder Antigen-Epitop, einem Hormon, einem Hormorezeptor, einem Enzym, einem Enzymsubstrat, einem Lektin, zucker-tragenden Aminosäuren, insbesondere aus einem Histidin-reichen Peptid (His-Tag), einem mehr-

5 fach geladenen Peptid, der Glutathion-S-Transferase (GST-Tag), einem F<sub>c</sub>-Teil eines Antikörpers, einer Immunglobulin-bindenden Domäne, beispielsweise Protein A oder Protein G oder ein Teil davon, einem Lecitin, einer Nukleinsäure-Bindestelle, einer Heparin-Bindestelle, einem spezifischen Liganden, einem spezifischen Rezeptor, einem Integrin, einem Cytokin oder einer Rezeptor-Bindungsdomäne von einem Cytokin, Integrin oder Wachstumsfaktor, an einem Zelloberflächenrezeptor bindenden einzelkettigen Antikörper, einem Antikörper gegen Zelloberflächenstrukturen, einem Epitop und/oder einer antikörperbindenden Struktur.

10

12. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß ein Peptid insertiert wird, das die Sequenz QAGTFALRGDNPQG hat.

15

13. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturprotein mindestens eine weitere Mutation enthält.

14. Strukturprotein nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere(n) Mutation(en) eine Änderung der Infektiosität des Virus bewirkt.

20

15. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere(n) Mutation(en) eine Verringerung der Antigenität des Virus bewirkt.

25

16. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere(n) Mutation(en) eine oder mehrere Deletion(en), eine oder mehrere Insertion(en) oder eine Kombination der genannten Modifikationen ist/sind.



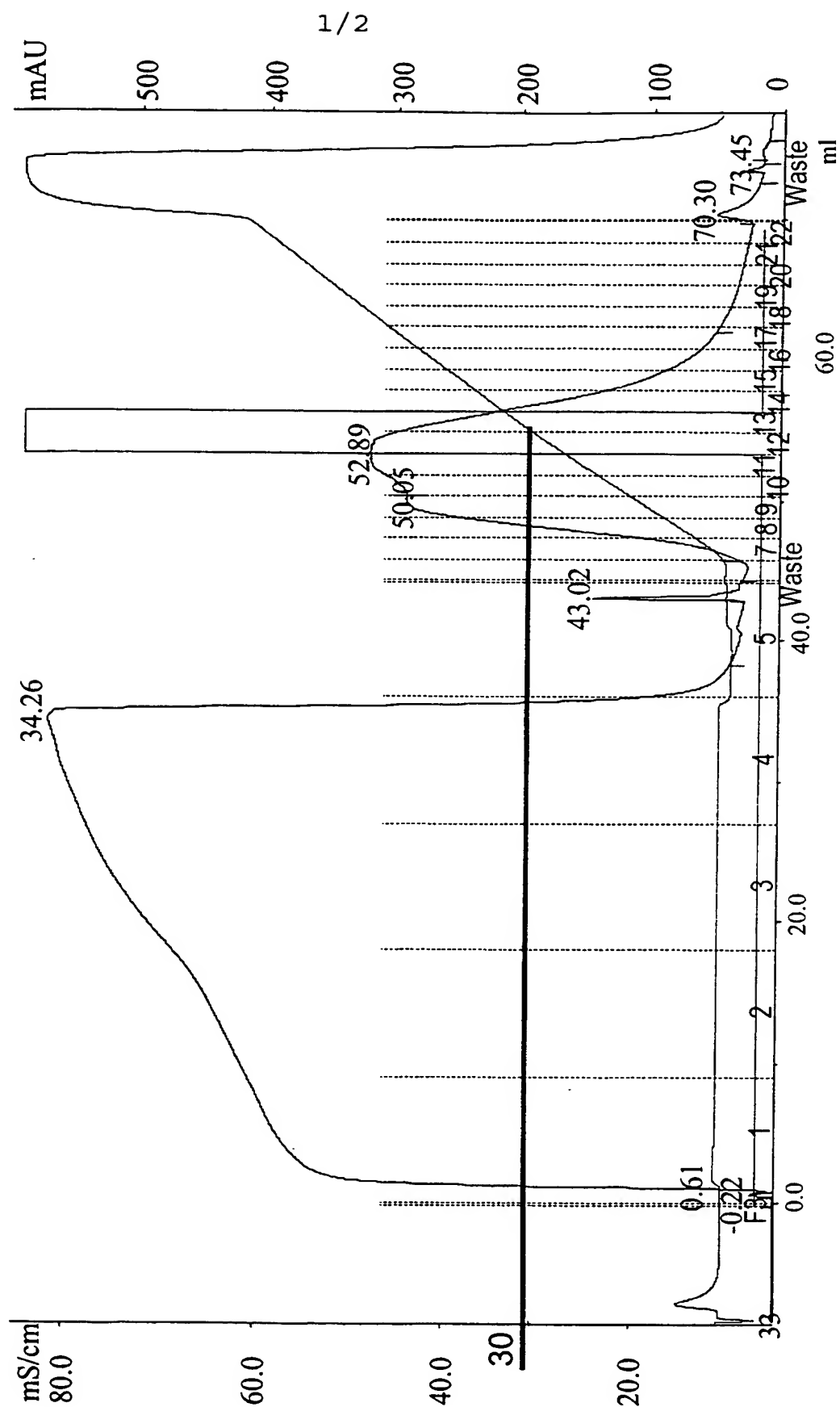
17. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertion ein Zellmembranrezeptor-Ligand, ein Rep-Protein oder -Peptid, ein immunsuppressives Protein oder Peptid und/oder ein Protein oder Peptid mit einem Signal zur Doppelstrangsynthese des Fremdgens ist.
18. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertion ausgewählt ist aus einem Integrin, einem Cytokin oder einer Rezeptor-Bindungsdomäne von einem Cytokin, Integrin oder Wachstumsfaktor, an einem Zelloberflächenrezeptor bindenden einzelkettigen Antikörper, einem Antikörper gegen Zelloberflächenstrukturen, einer antikörperbindenden Struktur oder einem Epitop.
19. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) an der Virusoberfläche lokalisiert ist/sind.
20. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) am N-Terminus des Strukturproteins lokalisiert ist/sind.
21. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) durch eine oder mehrere Insertionen an der XhoI-Schnittstelle der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.

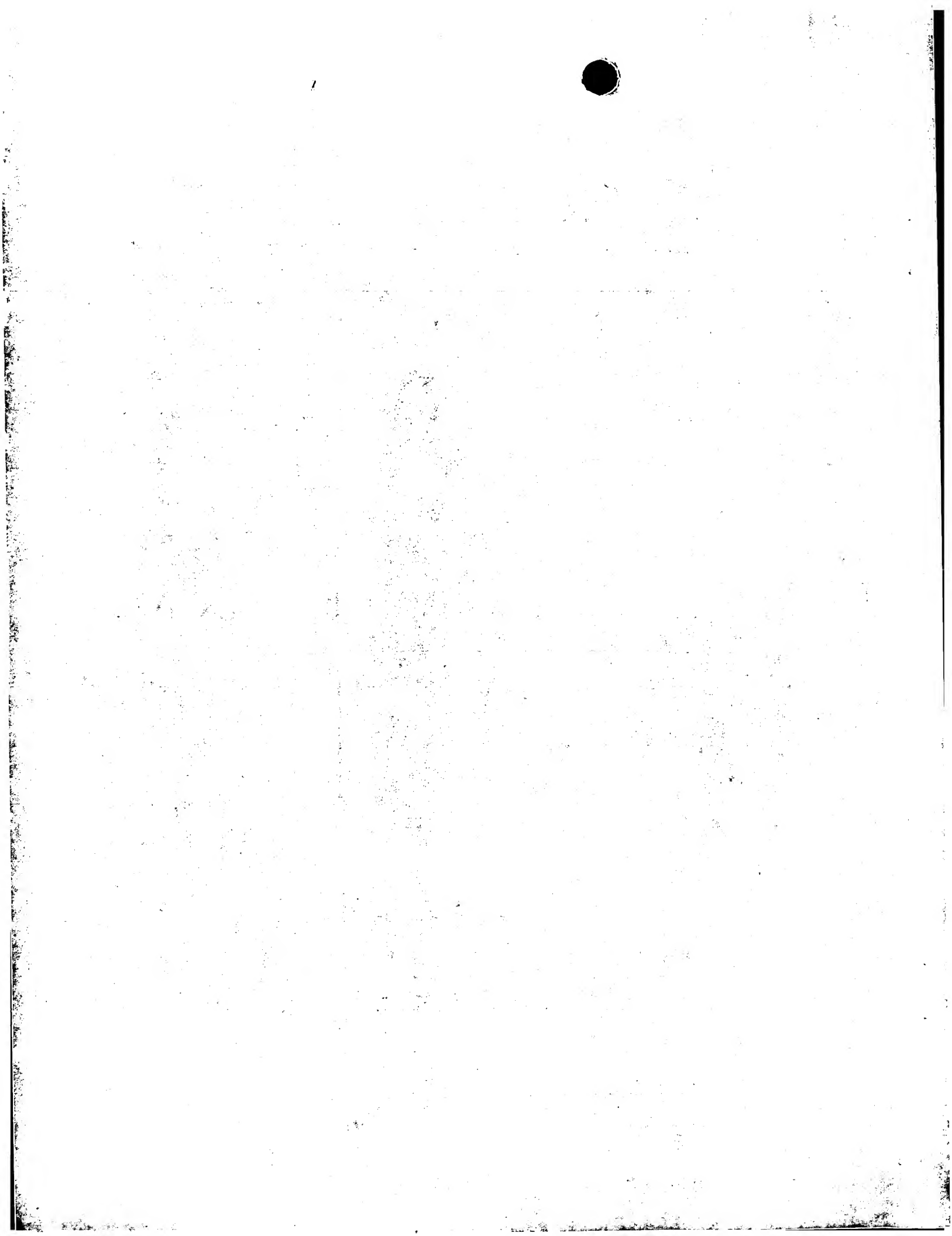
22. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) durch eine oder mehrere Insertionen an der BsrBI-Schnittstelle der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.
- 5 23. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure und eine oder mehrere Insertionen bewirkt wird/werden.
- 10 24. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den XhoI-XhoI-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.
- 15 25. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.
- 20 26. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Insertionen in VP3 vor und/oder nach mindestens einer Aminosäure in der Sequenz ausgewählt aus YKQIS SQSGA, YLTLN NGSQA, YYLSR TNTPS, EEKFF PQSGV, NPVAT EQYGS, LQRGN RQAAT, NVDFT VDTNG, lokalisiert ist/sind.
- 25 27. Strukturprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 26 in Form eines AAV-Partikels, insbesondere in Form eines AAV-Kapsids.

28. Nukleinsäure, kodierend für ein Strukturprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 27.
- 5 29. Zelle, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 28.
30. Verfahren zur Herstellung eines Strukturproteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zelle gemäß Anspruch 29 kultiviert und ggf. das exprimierte Strukturprotein isoliert wird.
- 10 31. Arzneimittel, enthaltend ein Strukturprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 27, eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 28 und/oder eine Zelle gemäß Anspruch 29 und/oder gegebenenfalls Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
- 15 32. Verwendung eines Strukturproteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 27, einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 28 bzw. einer Zelle gemäß Anspruch 29 für die Aufreinigung von AAV und AAV-Partikeln, für die Änderung des Tropismus von AAV, für die Änderung der Antigenität von AAV, für die Transformation einer Zelle, für das genomische Targeting, für die Diagnostik, für Wirksamkeitsuntersuchungen und/oder für die Gentherapie.
- 20



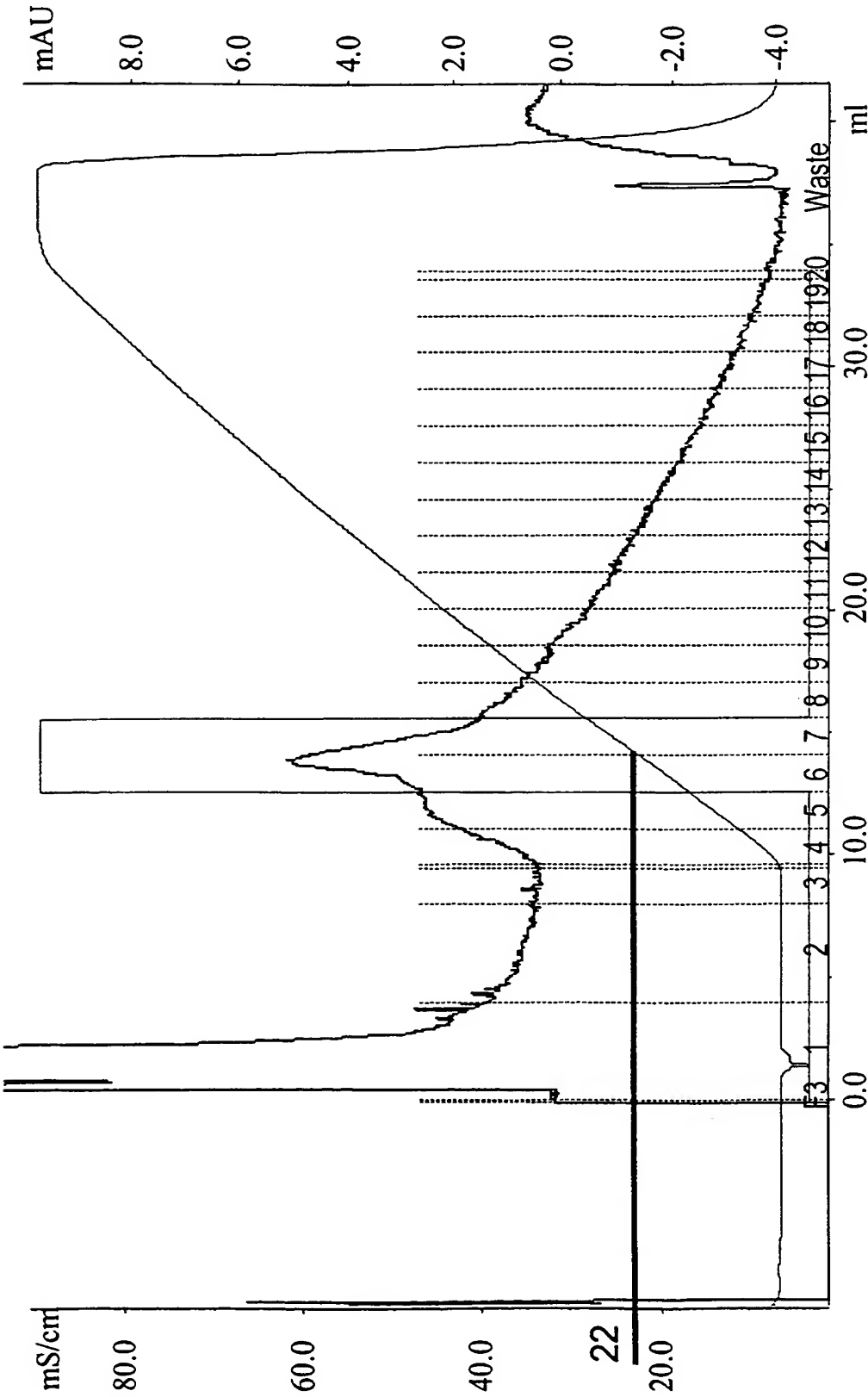
Fig. 1





2/2

Fig. 2







## SEQUENZPROTOKOLL

5       <110> MediGene Aktiengesellschaft

          <120> Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus mit veränderten  
                  chromatographischen Eigenschaften, seine Herstellung und Verwen-  
                  dung

10

          <140> 199 33 719.5-41

          <141> 17.07.1999

          <160> 18

15

          <170> Microsoft Word 97

          <210> 1

          <211> 14

20

          <212> PRT

          <213> Mus musculus

          <400> 1

25

Gln Ala Gly Thr Phe Ala Leu Arg Gly Asp Asn Pro Gln Gly  
14

          <210> 2

30

          <211> 10

          <212> PRT

          <213> Adeno-assoziiertes Virus

          <400> 2



Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala  
10

5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Adeno-assoziiierter Virus

10

&lt;400&gt; 3

Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala  
10

15

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Adeno-assoziiierter Virus

20

&lt;400&gt; 4

Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser  
10

25

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Adeno-assoziiierter Virus

30

&lt;400&gt; 5

Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val  
10



<210> 6  
<211> 5  
<212> PRT  
5 <213> Adeno-assoziiertes Virus

<400> 6

10 Asn Pro Val Ala Thr  
5

<210> 7  
<211> 5  
<212> PRT  
15 <213> Adeno-assoziiertes Virus

<400> 7

20 Glu Gln Tyr Gly Ser  
5

<210> 8  
<211> 10  
<212> PRT  
25 <213> Adeno-assoziiertes Virus

<400> 8

30 Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr  
10

<210> 9  
<211> 10  
<212> PRT



4

&lt;213&gt; Adeno-assoziiertes Virus

&lt;400&gt; 9

5 Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly  
10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 10

10 <212> PRT

&lt;213&gt; künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; mutiertes VP3 von Adeno-assoziiertes Virus

15

&lt;400&gt; 10

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala  
10

20

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; künstliche Sequenz

25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; mutiertes VP3 von Adeno-assoziiertes Virus

&lt;400&gt; 11

30

Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala  
10

&lt;210&gt; 12





<211> 10

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

5 <220>

<223> mutated VP3 of adeno-associated virus

<400> 12

10 Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser  
10

<210> 13

<211> 10

15 <212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> mutated VP3 of adeno-associated virus

20

<400> 13

Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val  
10

25

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

30

<220>

<223> mutated VP3 of adeno-associated virus

<400> 14



Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser  
10

5 <210> 15  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> künstliche Sequenz

10 <220>  
<223> mutated VP3 of adeno-associated virus

<400> 15

15 Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr  
10

<210> 16  
<211> 10  
20 <212> PRT  
<213> künstliche Sequenz

<220>  
<223> mutated VP3 of adeno-associated virus

25 <400> 16

Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly  
10

30 <210> 17  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Mus musculus



<400> 17

5      Arg Gly Asp Ser  
         4

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

10      <213> künstliche Sequenz

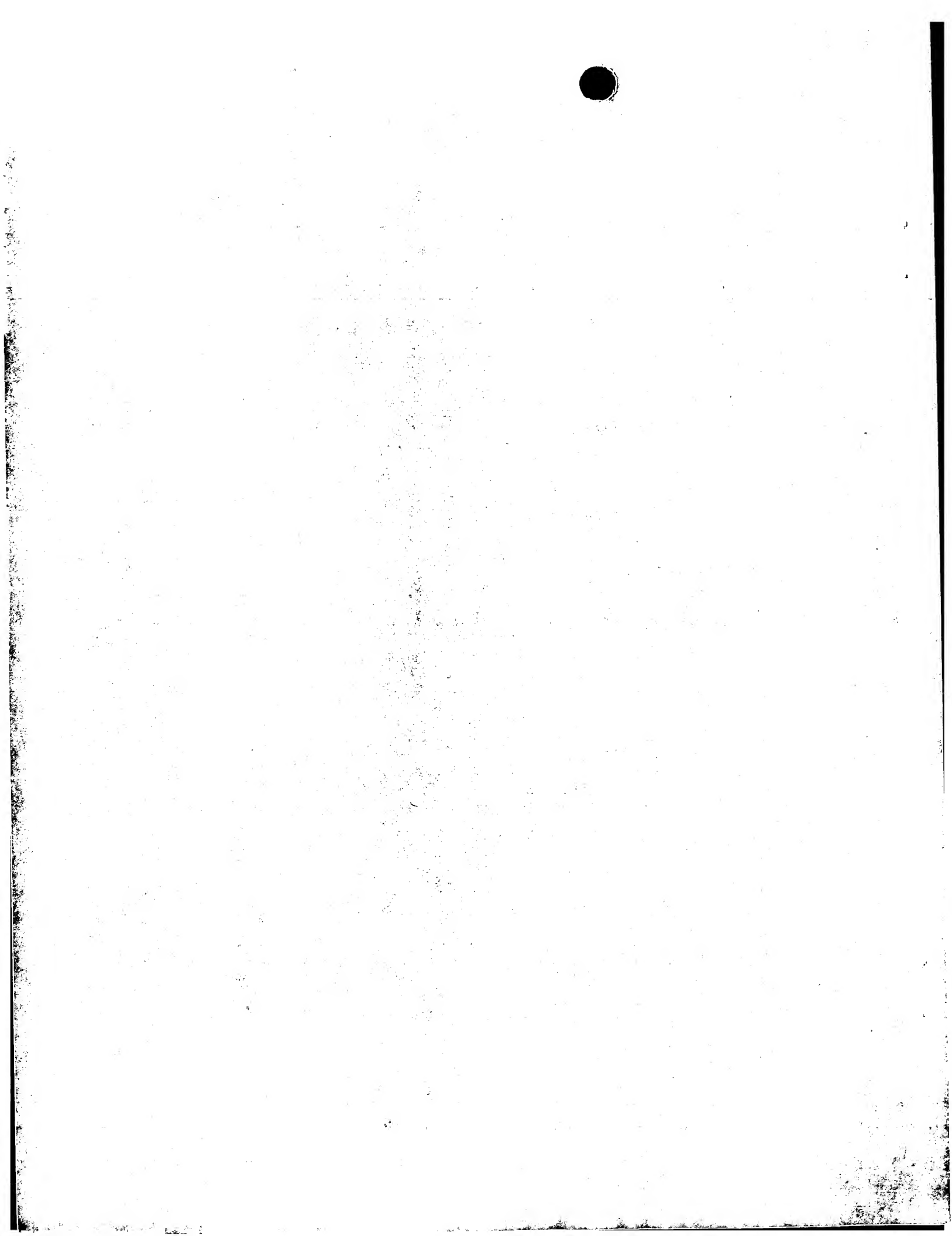
<220>

<223> mutated laminin peptide

15      <400> 18

Arg Gly Glu Ser  
4

20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten Application No  
PCT/EP 00/06861

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/864 C12N15/35 C12N15/62 C07K14/015 C07K19/00  
C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/68 A61K39/23 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K C12Q G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 38723 A (BARBER JACK ; IMMUSOL INC (US); LI QI XIANG (US); YU GANG (US); YU 23 October 1997 (1997-10-23)	1-11, 13-20; 26-32
Y	page 4, line 21 -page 5, line 2 page 17, line 11 -page 18, line 2 page 26, line 17 -page 27, line 7 example 1 example 2C  ---  -/--	12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 2000

Date of mailing of the international search report

28/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

.nal Application No

PCT/EP 00/06861

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YANG Q. ET AL.: "DEVELOPMENT OF NOVEL CELL SURFACE CD34-TARGETED RECOMBINANT ADENOASSOCIATED VIRUS VECTORS FOR GENE THERAPY" HUMAN GENE THERAPY, vol. 9, no. 13, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 1929-1937, XP000867311 ISSN: 1043-0342 the whole document</p>	1-11, 13-20, 26-32
Y	<p>-----  VALSESIA-WITTMANN S. ET AL.:  "MODIFICATIONS IN THE BINDING DOMAIN OF AVIAN RETROVIRUS ENVELOPE PROTEIN TO REDIRECT THE HOST RANGE OF RETROVIRAL VECTORS"  JOURNAL OF VIROLOGY,  vol. 68, no. 7, 1 July 1994 (1994-07-01),  pages 4609-4619, XP000616602  ISSN: 0022-538X  cited in the application  the whole document</p>	12
A	<p>-----  WICKHAM T. J. ET AL.: "Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins"  JOURNAL OF VIROLOGY,  vol. 11, no. 71,  1 November 1997 (1997-11-01), pages  8221-8229, XP002078898  ISSN: 0022-538X  the whole document</p>	1-32
A	<p>-----  WO 96 00587 A (UNIV PITTSBURGH)  11 January 1996 (1996-01-11)  page 5, line 10 - line 14  page 23, line 11 -page 24, line 25</p>	1-32
P,X	<p>-----  GIROD A. ET AL.: "GENETIC CAPSID MODIFICATIONS ALLOW EFFICIENT RE-TARGETING OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2"  NATURE MEDICINE,  vol. 5, no. 9, September 1999 (1999-09),  pages 1052-1056, XP002128040  ISSN: 1078-8956  cited in the application  the whole document</p>	1-13, 26-32
P,X, L	<p>-----  WO 99 67393 A (MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT ;RIED MARTIN (DE); GIROD ANNE (DE); HA)  29 December 1999 (1999-12-29)  L: Priorität  the whole document</p>	1-32



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Interr. Application No

PCT/EP 00/06861

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9738723	A	23-10-1997	AU 2678097 A CA 2251738 A EP 0927044 A	07-11-1997 23-10-1997 07-07-1999
WO 9600587	A	11-01-1996	AU 705564 B AU 2913895 A CA 2193802 A EP 0766569 A JP 10502526 T US 5863541 A	27-05-1999 25-01-1996 11-01-1996 09-04-1997 10-03-1998 26-01-1999
WO 9967393	A	29-12-1999	DE 19827457 C AU 4614199 A	02-03-2000 10-01-2000



# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 00/06861

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/864 C12N15/35 C12N15/62 C07K14/015 C07K19/00  
C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/68 A61K39/23 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K C12Q G01N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 38723 A (BARBER JACK ; IMMUSOL INC (US); LI QI XIANG (US); YU GANG (US); YU) 23. Oktober 1997 (1997-10-23)	1-11, 13-20, 26-32
Y	Seite 4, Zeile 21 -Seite 5, Zeile 2 Seite 17, Zeile 11 -Seite 18, Zeile 2 Seite 26, Zeile 17 -Seite 27, Zeile 7 Beispiel 1 Beispiel 2C --- -/--	12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>YANG Q. ET AL.: "DEVELOPMENT OF NOVEL CELL SURFACE CD34-TARGETED RECOMBINANT ADENOASSOCIATED VIRUS VECTORS FOR GENE THERAPY"</p> <p>HUMAN GENE THERAPY, Bd. 9, Nr. 13, 1. September 1998 (1998-09-01), Seiten 1929-1937, XP000867311 ISSN: 1043-0342 das ganze Dokument</p>	1-11, 13-20, 26-32
Y	<p>VALSESIA-WITTMANN S. ET AL.: "MODIFICATIONS IN THE BINDING DOMAIN OF AVIAN RETROVIRUS ENVELOPE PROTEIN TO REDIRECT THE HOST RANGE OF RETROVIRAL VECTORS"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 68, Nr. 7, 1. Juli 1994 (1994-07-01), Seiten 4609-4619, XP000616602 ISSN: 0022-538X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	12
A	<p>WICKHAM T. J. ET AL.: "Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 11, Nr. 71, 1. November 1997 (1997-11-01), Seiten 8221-8229, XP002078898 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument</p>	1-32
A	<p>WO 96 00587 A (UNIV PITTSBURGH) 11. Januar 1996 (1996-01-11) Seite 5, Zeile 10 - Zeile 14 Seite 23, Zeile 11 -Seite 24, Zeile 25</p>	1-32
P,X	<p>GIROD A. ET AL.: "GENETIC CAPSID MODIFICATIONS ALLOW EFFICIENT RE-TARGETING OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2"</p> <p>NATURE MEDICINE, Bd. 5, Nr. 9, September 1999 (1999-09), Seiten 1052-1056, XP002128040 ISSN: 1078-8956 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-13, 26-32
P,X, L	<p>WO 99 67393 A (MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT ;RIED MARTIN (DE); GIROD ANNE (DE); HA) 29. Dezember 1999 (1999-12-29) L: Priorität das ganze Dokument</p>	1-32

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern Aktenzeichen

PCT/EP 00/06861

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9738723 A	23-10-1997	AU 2678097 A CA 2251738 A EP 0927044 A	07-11-1997 23-10-1997 07-07-1999
WO 9600587 A	11-01-1996	AU 705564 B AU 2913895 A CA 2193802 A EP 0766569 A JP 10502526 T US 5863541 A	27-05-1999 25-01-1996 11-01-1996 09-04-1997 10-03-1998 26-01-1999
WO 9967393 A	29-12-1999	DE 19827457 C AU 4614199 A	02-03-2000 10-01-2000



1  
2  
3

4  
5  
6